

Artigo de Revisão Bibliográfica **Mestrado Integrado em Medicina**

Tratamento das lesões do LCA em atletas: Futura aplicação da engenharia de tecidos?

Autor:
Jorge Chaves Monteiro

Orientador:
Dr. Adélio Vilaça

Porto 2017

Tratamento das lesões do LCA em atletas: Futura aplicação da engenharia de tecidos?

Jorge Chaves Monteiro

Tese de Mestrado Integrado em Medicina apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto Rua Jorge Viterbo Ferreira n° 228, 4050-313 Porto, Portugal

Área: Ortopedia

Orientador: Dr Adélio Vilaça

Categoria: Assistente Graduado e Assistente Convidado da Unidade Curricular de Ortopedia no ICBAS-UP/CHP

Afiliação: Serviço de Ortopedia do Centro Hospitalar do Porto

Correspondência: jorge.ch.monteiro@gmail.com

Resumo

O ligamento cruzado anterior (LCA) é um dos ligamentos estabilizadores do joelho mais importantes. Também é um dos ligamentos intra-articulares mais lesado dos membros inferiores em acidentes desportivos e não desportivos. No caso de atletas de alta competição é imperativo conseguir propor a opção que mais hipóteses tenha de que o doente retorne ao nível pré-lesão.

Devido a sua vascularização escassa e a hipo-celularidade presentes nestes tecidos, uma lesão do LCA tem pouca capacidade de cura ou regeneração sendo o desfecho normal uma substituição cirúrgica.

Actualmente as opções existentes têm diferentes limitações; actualmente, proporcionam a somente aproximadamente a 50% dos doentes um retorno de nível pré-lesão. [1, 2]

Esta dificuldade levou a um interesse crescente num campo científico emergente chamado Engenharia de Tecidos, para futuras técnicas de reparação.

Desde logo o impacto económico e social associado a estas lesões é por si só um forte motivo para uma melhor compreensão da possibilidade de novos tratamentos recorrendo a Engenharia de tecidos.

O objectivo desta nova abordagem com tecidos construídos de raiz é tentar mimetizar o melhor possível os tecidos originais. Para isso utilizam-se vários tipos de esqueletos matriciais (ou “scaffolds”), diversos tipos de células e ainda diferentes combinações de factores de crescimento promovendo a regeneração tecidual tentando com isto atingir propriedades biomecânicas similares ao tecido original. [3][4]

Vistos os vários problemas que acarretam as opções cirúrgicas actuais das lesões do LCA proponho-me analisar as possibilidades de novas terapias elaboradas graças à engenharia tecidual, e fazer uma revisão na literatura científica sobre o tema.

Fontes dos dados:

Pesquisa em diversas bases de dados, entre elas: Pubmed, ScienceDirect e Ebsco, uptodate com artigos publicados entre 1976 e 2017.

Conclusão:

Apesar de ainda poucos ensaios clínicos, há fortes hipótese que a Engenharia de tecido venha a ater um papel central na abordagem a lesões do LCA.

Palavras-chave: Ligamento cruzado anterior (LCA); Articulação, Ligamentos, Bio-mecânica, ligamentos articulares; lesões do joelho; Scaffold; Engenharia de tecidos; terapia genética, medicina regenerativa, bioreactores

Abstract

The anterior cruciate ligament (ACL) is one of the most important knee stabilizing ligaments. It is also one of the most injured intra-articular ligaments of the lower limbs in sports and non-sports accidents. In the case of high competition athletes it is imperative to be able to propose the option that has most likely chances to return to the pre-injury level.

Due to their scarce vascularity and the hypo-cellularity present in these tissues, an ACL injury has little capacity for healing or regeneration, with the normal outcome being a surgical replacement.

Currently the existing options have different limitations, but currently, it provides only about 50% of patients with a pre-injury level return. [1, 2]

This difficulty led to a growing interest in an emerging scientific field called Tissue Engineering for future repair techniques.

Moreover, the economic and social impact associated with these lesions is in itself a strong reason for a better understanding of the possibility of new treatments using tissue engineering.

The aim of this new approach is to try to mimic in the best possible way the original tissue. For this purpose, several types of matrix skeletons (or "scaffolds"), cell types and different combinations of growth factors are used to promote tissue regeneration in order to achieve bio-mechanical properties similar to the original tissue. [3][4]

Considering the various problems involved in the current surgical options of ACL lesions, I propose to analyse the possibilities of new therapies elaborated through tissue engineering and to reviewing the scientific literature on the subject.

Sources of data:

Research in several databases, among them: Pubmed, ScienceDirect and Ebsco, uptodate with articles published between 1976 and 2017.

Conclusion:

Although there are still few clinical trials, there is strong hypothesis that tissue engineering will play a central role in approaching ACL lesions.

Keywords: Anterior cruciate ligament (ACL); Articulation, Ligaments, Bio-mechanics, joint ligaments; Knee injuries; Scaffold; Tissue engineering; Gene therapy, regenerative medicine, Bioreactors

INDICE:

Resumo	3
Abstract	4
Introdução	6
Biologia tecidual e ligamentar	7
Fisiologia da Cicatrização ligamentar	7
Opções de reparação e tratamento actuais	8
Engenharia tecidual (Reparação ligamentar bio-potenciada)	9
Biologia Celular	10
Fibroblastos	11
Células Estaminais Mesenquimais (CEM)	11
Factores de Crescimento (FC)	12
Plasma rico em plaquetas (PRP)	12
Scaffolds - materiais e arquitectura	13
Bridge-Enhanced ACL Repair (BEAR Scaffold)	15
Bioreactores	15
Terapia genética	16
Conclusão	16
Bibliografia	17

Introdução

O Ligamento Cruzado Anterior (LCA) é umas das estruturas do joelho mais comumente lesadas, mudando a biomecânica e a cinemática da articulação resultando em instabilidade e perda de função. [5]

A incidência exacta de lesões do LCA é difícil de estimar pois os estudos usam diferentes métodos de contagem (por exemplo uns usam “casos/ano” e outros “casos/1000horas de treino”). [5] Actualmente, na literatura científica, a incidência está estimada aproximadamente a 200,000 casos e 100,000 reconstruções cirúrgicas anualmente nos EUA, sendo provável que estes números sejam subestimados e estejam a aumentar por uma maior adesão ao desporto por parte da população geral. [6, 7]

Vários factores de risco estão descritos na literatura científica, como: serem atletas de alta competição em desportos de contacto com manobras rápidas de mudança de direcção e saltos como a “cuting maneuver” e em desequilíbrio, ser de sexo feminino devido a postura anatómica de maior extensão a nível do membro inferior, maior valgismo e abdução do joelho e maior rotação interna da anca, contração mais tardia dos músculos isquiotibiais, menor força muscular global, maior laxidão articular e balanço do quadricípete/isquiotibiais inadequado. [8, 9]

Actualmente tem-se vindo a constatar um interesse crescente na prevenção primária começando-se a instruir atletas e treinadores neste tipo de lesões de tecidos moles e implementando programas preventivos, Sendo estes essenciais (é o caso do FIFA11+ por exemplo) na diminuição da incidência e morbilidade das lesões. [9, 10]

Mas por mais que estes programas de prevenção resultem nas lesões sem contacto, as de contacto e choque directo não são prevenidas.

Torna-se importantíssimo no caso de atletas de alta competição o retorno ao nível de desempenho pré-lesão, o que actualmente ainda não é o desfecho mais provável. [1]

A abordagem das lesões do LCA constitui um desafio, devido à sua biomecânica ainda mal compreendida, incapacidade de regeneração pelo tipo de tecido, fraco acesso vascular (ramos da artéria genicular media) que também é lesado e as várias complicações e osteoartrose, que surgem de uma forma temporal, das estruturas adjacentes. [11]

A taxa de falência da reparação cirúrgica do LCA simples usando sutura simples é substancialmente alta (40%-100% dependendo do estudos). Estes resultados insatisfatórios da reparação primária do LCA levaram ao abandono da técnica de reparação por sutura directa e adoção da cirurgia de reconstrução do LCA. [12-14] Um leque variado de opções está atualmente disponível, desde modalidades conservadoras a variadas técnicas cirúrgicas.

Assim a reconstrução do LCA tem permanecido como “Gold-Standard” para lesões, especialmente para os jovens e atletas que pretendem retornar a atividades desportivas de alto nível, embora a idade tenha deixado de ser um critério decisivo para a exclusão da opção cirúrgica, sendo essa abordagem cada vez mais comum em doentes com idade superior a 40 anos devido ao aumento da esperança média de vida e da qualidade de vida da população e um tendência aumentada para a atividade física por parte das pessoas com mais idade. [15]

Embora a maioria das cirurgias de reconstrução do LCA restaurem com êxito a estabilidade grosseira da articulação, o longo período de reabilitação pós-cirúrgico, a osteoartrose pós-traumática comum após essas lesões, mesmo com a reconstrução do LCA, a taxa de re-lesão mais alta, do que a da população geral, mesmo após uma recuperação total, indica que a reconstrução ligamentar provavelmente não atingiu a mesma eficiência da original. Todos estes problemas tornam-se mais importantes em atletas, pois acarretam uma perda óbvia da massa muscular e um longo tempo de recuperação, entre outros problemas, pondo em risco as carreiras. [16, 17][18-20]

O que me proponho a fazer é uma revisão das possibilidades de terapias actuais tentando saber se a Engenharia de tecidos pode ajudar a melhorar o prognóstico e a rapidez de recuperação dos atletas com esta lesão passando de uma era de substituição tecidual, para uma tentativa de reparação e regeneração de tecidos lesados.

Biologia tecidual e ligamentar

Os ligamentos periarticulares foram, em tempos considerados estruturas inertes e sem grande interesse mas actualmente são vistos como tecidos dinâmicos e bio-reactivos que influenciam estruturas peri-ligamentares, como também são da maior importância na propriocepção articular.

Os ligamentos são um tipo de tecido conjuntivo denso, modelado e especializado formado por um feixe de tecido fibroso, que une entre si duas extremidades ósseas de uma articulação (ligamento articular, caso do LCA) ou mantém no seu local fisiológico habitual um órgão interno (ligamento suspensor). É constituído por fibras de colagénio ordenadas em feixes compactos e paralelos, o que lhe dá grande resistência mecânica. Essas mesmas fibras são ancoradas, no caso de ligamentos articulares, nos ossos em feixes fibrosos. Um ligamento pode ligar dois ou mais ossos e estão também presentes nas cápsulas articulares. Os ligamentos variam ligeiramente na sua constituição dependendo da articulação.

Todos os tecidos do corpo humano são compostos por dois componentes fundamentais: por células e matriz extra-celular com os seus diferentes componentes.

Na arquitectura fisiológica humana nenhum tecido é autossuficiente necessitando sempre de aporte sanguíneo para assegurar a homeostasia. No caso dos ligamentos, especialmente no LCA, normalmente esse aporte é escasso acabando por ser uma grande entrave à regeneração, pois implica uma falta de facilidade de acesso aos diferentes factores, nutrientes e células necessários à regeneração de qualquer tecido. [21]

Nos ligamentos os fibroblastos são o tipo de célula mais comum e a matriz é composta maioritariamente por água, colagénio tipo I (85%) e III, proteoglicanos e elastina. [22, 23] Estes fibroblastos tem um papel activo secretando vários factores de crescimento, mantendo, reparando e regenerando o ligamento. A matriz extra-celular é por sua vez a componente mais importante na função biomecânica do tecido, sendo necessário compreender a construção tridimensional requerida e os componentes moleculares para as células proliferarem e fazer o seu trabalho, de regeneração e depois manutenção tecidual, da melhor maneira.

Fisiologia da Cicatrização ligamentar

Uma lesão ligamentar implica uma mudança drástica quer na sua estrutura quer na fisiologia. A resposta do corpo humano é, na melhor das hipóteses, uma substituição do tecido por um tecido cicatricial que é fisiologicamente e bio-mecanicamente diferente do tecido original, sendo sem dúvida inferior na capacidade de cumprir a sua função. [22]

Estas lesões, ao longo do tempo e independentemente do tratamento, parecem causar danos a estruturas adjacentes, isto é devido a deixarem uma instabilidade e mobilidade não fisiológica causam alterações na biomecânica da articulação, que assim passa a ter uma resposta patológicas às forças exercidas na articulação levando a danos, por exemplo, osteoartrite dalgumas estruturas. [16, 24]

Sendo o objectivo uma reparação do LCA é importante percebermos o que se passa a nível fisiológico e o porquê de no caso dos ligamentos intra-articulares a sua reparação fisiológica é virtualmente inexistente, sendo necessário mais investigação nesta área.

Quando há lesão com rotura de ligamento a cicatrização ligamentar é feito em vários passos: hemóstase rápida conseguida por uma vasoconstrição aguda e o sistema de coagulação, seguida de um processo inflamatório onde a lesão é limpa e é criado espaço para novo tecido, depois dá-se a proliferação, migração e colonização celular do tecido numa tentativa de renová-lo, para isso é necessário ocorrer ao mesmo tempo angiogenese e por fim seria de esperar um novo tecido com características semelhantes ao original. O problema é que nas lesões ligamentares isto não ocorre, sendo o tecido conjuntivo substituído por tecido fibroso muito menos dinâmico, resistente e adaptativo. Necessárias são por isso as terapias de substituição cirurgias actualmente praticadas. [25]

No entanto, o desenvolvimento de um método regenerativo para a reparação biológica do LCA obriga a uma melhor compreensão do motivo pelo qual a reparação fisiológica primária não é

bem-sucedida. Na última década, os investigadores começaram a compreender os mecanismos subjacentes à incapacidade de cicatrização de um LCA lesionado, o que contrasta diretamente com a alta capacidade de cicatrização dos tecidos conectivos extra-articulares, como o ligamento colateral medial (LCM) (extra-articular). [26-28]

Opções de reparação e tratamento actuais

Os tratamentos actuais passam por abordagem conservadora (sem reconstrução) ou cirúrgica.

O tratamento conservador está tradicionalmente reservado para doentes que não têm altos níveis de atividade física, como os idosos e pessoas que consigam lidar com a instabilidade articular sem alteração significativa da qualidade de vida. Por isso não é uma opção satisfatória para os casos de lesões em atletas.

Historicamente as primeiras tentativas de reparação cirúrgica foram feitas a partir de suturas reaproximando as duas extremidades do LCA rasgadas descrita por Robson. [29] Mais tarde foi mostrado, num estudo descrevendo os resultados a longo-prazo desta técnica, que este tratamento falhava em mais de 90% dos casos. [30]

Actualmente existem diversas hipóteses cirúrgicas feitas por uma substituição do ligamento por alo-enxertos ou auto-enxertos para o tratamento da lesão do LCA, sendo que o auto-enxerto osso-tendão-osso (OTO), recolhidos na rótula, os autoenxertos isquiotibiais (IT) e ou tendão quadricipital (TQ) são os mais utilizados para a reconstrução do LCA.

A principal vantagem da escolha de OTO relativamente ao IT é conseguir uma melhor estabilização. [2] No entanto, o uso de IT tem vindo a aumentar, pois tem uma menor morbilidade na recolha do enxerto e menos complicações pós-cirúrgicas, apesar da diminuição da força a nível dos músculos da coxa. Desta maneira, alguns autores consideram que pode ser clinicamente significativo e por isso levantam a possibilidade do uso de IT ter um resultado com pior estabilização da articulação e por isso levar a um maior risco de uma nova lesão. [7]

Contudo revisões sistemáticas mostram que não há evidência de que haja melhores resultados com qualquer uma das abordagens de auto-enxertos em relação a estabilidade, dor, amplitude de movimento, nível de actividade ou experiência relatada pelo paciente após a reconstrução. [31-34]

As terapias actuais de reparação cirúrgica têm algumas desvantagens inerentes relacionadas com, no caso dos auto-enxertos, a morbilidade do local dador, fraqueza do mecanismo quadricipital ou da flexão do joelho, fratura da rótula, diferentes tamanhos do enxerto, longos tempos cirúrgicos com consequente atraso no retorno a actividade física. Já os aloenxertos cadavéricos têm apresentado bons resultados, pois permitem um menor tempo cirúrgico, eliminam a morbilidade do local dador e têm tamanhos de enxerto mais consistentes; contudo, esta opção apresenta um aumento no risco de infeção e transmissão de doenças, a possibilidade de desencadear reações autoimunes, enfraquecimento do tecido pelo processo de esterilização, aumento dos custos e tempos de incorporação, e menor estabilidade e força. [17]

Não existe actualmente consenso na decisão terapêutica, apesar de estarem descritas algumas orientações. [17]

Acresce que foi reportado que 40% a 90% dos pacientes que sofrem de lesões do LCA acabam por desenvolver osteoartrose do joelho ou outra patologia meniscal, provavelmente devido a mecânica alterada. [35, 36]

As complicações associadas à reconstrução/substituição cirúrgica, apesar de seu inegável sucesso, levaram a um interesse por parte dos ortopedistas na engenharia tecidual funcional, tentando uma aproximação de uma reparação biológica do LCA como alternativa à reconstrução. [26, 37, 38]

Um melhor conhecimento das características de cicatrização do LCA tem ajudado investigadores e clínicos a introduzir novas abordagens de tentativa de reparo biológico LCA. Estas alternativas à reconstrução cirúrgica atual têm o potencial de preservar o local de inserção nativo e a função proprioceptiva, o que pode, por sua vez, levar a uma mecânica articular mais próxima da original e a menor risco de osteoartrite pós-traumática.

Novas técnicas foram por isso criadas como por exemplo, a "técnica de resposta à cicatrização", iniciada por Steadman et al. em que são criados micro-orifícios no fêmur perto do local de inserção da LCA, levando a formação de um coágulo de sangue e formação de hematoma. Acredita-se que a cicatrização do ligamento é induzida pela alta concentração das células reparadoras perto das extremidades rasgadas da LCA como resultado do hematoma criado.

A recente integração da engenharia de tecidos funcionais na tentativa de reparo de LCA deixou o corpo clínico e de investigação com múltiplas abordagens inovadoras para tratar lesões de LCA com melhores resultados.

Visto que uma lesão do LCA pode acabar com a carreira de um atleta é decerto importante poder oferecer a opção que maximiza as hipóteses dos atletas retornarem ao activo e isto num menor tempo possível e com o melhor prognóstico a longo prazo possível. Visto que o prognóstico da reparação desta lesão actualmente ainda não é satisfatório em termos de recuperação completa [2] é do interesse do doente debruçarmo-nos sobre novas terapias. Nisto a engenharia tecidual parece ser uma boa aposta já com um início promissor. [18]

Engenharia tecidual (Reparação ligamentar bio-potenciada)

A engenharia tecidual é uma disciplina científica emergente e revolucionária, erguida sobre três principais pilares: biologia celular, factores de crescimento celulares e engenharia de materiais em forma de aparelhos chamados Scaffolds tentando recriar e substituir temporalmente tecidos diferenciados encontrados in vivo no ser humano.

Acho importante também falar de mais dois temas, os bioreactores e as terapias genéticas, os quais podem ter um papel importante e até decisivo no futuro desta nova abordagem.

O objectivo desta ciência é tentar regenerar tecidos lesados humanos. Sendo os vários tipos de tecidos diferentes na sua composição celular e matricial, é importante pensar em termos de tecido conjuntivo ligamentar e osso no caso da tentativa de regeneração do LCA.

Tendo conhecimento dos vários limites do actual tratamento de lesões do LCA, a comunidade ortopédica tem vindo a fazer um esforço para integrar da forma mais segura possível este novo domínio científico na reparação cirúrgica. Estas reconstruções ligamentares têm a possibilidade de reduzir as falhas cirúrgicas, as complicações pela biomecânica alterada do tecido de substituição (OTO ou IT ou TQ), reduzir o tempo de recuperação e até potencialmente os custos na saúde pública. [39] A possibilidade de substituição terapêutica destas novas tecnologias nas cirurgias de reconstrução cutânea, óssea, cartilaginosa, tendinosa, ligamentar e até, possivelmente no futuro, neural é no mínimo uma perspectiva reconfortante e de interesse para qualquer equipa cirúrgica procurando devolver ao doente os melhores níveis de recuperação pós-lesão.

Ainda assim é importante referir que a grande maioria destas terapias estão numa fase experimental e que ainda falta caminho a percorrer até se tornarem procedimentos comuns, mas provavelmente vamos ver na próxima década uma melhoria franca no tratamento destas lesões graças às novas terapias possibilitadas pela Engenharia tecidual.

A especialidade de ortopedia, particularmente, beneficiaria bastante com estas novas terapias, pelo tipo de lesões músculo-esqueléticas com que se confronta no dia-a-dia com tecidos lesados por trauma ou doenças com pouco poder de cura e regeneração. A engenharia tecidual oferece assim uma maneira de transitar de terapias de substituição cirúrgica para uma abordagem por um mecanismo de regeneração.

Por isso, embora a cirurgia ortopédica tenha avançado no uso da engenharia de tecido na substituição da cartilagem, resta ver se haverá uma mudança da reposição de tecido para a regeneração de tecido e se esta será aplicável ao ligamento. [9]

Actualmente o que se faz na pratica clinica, numa tentativa de aumentar o sucesso e a rapidez de ligamentização do exerto, são injeções directas na articulação, nos túneis ósseos feitos nas cirurgias ou nas superfícies teciduais, quer de células como de factores de crescimento, antes da fixação do novo ligamento para melhorar a cicatrização do ligamento, osso e a zona de ancoragem do ligamento mas os estudos mostram que não é a melhor opção uma vez que desta maneira não há forma como controlar o local de atuação das terapias.

Ainda não sendo a melhor opção existem estudos que demonstram eficácia deste tipo de terapia. [40]

Usando este trio de células, scaffolds biomiméticos e factores de crescimento, é possível que a engenharia de tecidos possa ser implementada na reparação e regeneração de tecido como osso, cartilagem, tendão e ligamento. [41, 42]

Vou por isso de seguida fazer uma exposição dos vários intervenientes.

Biologia Celular

O primeiro ponto a clarificar é sem dúvida a parte celular. As células ligamentares são responsáveis por manterem estes tecidos vivos, é por isso, imprescindível, numa abordagem que procure uma regeneração completa a longo prazo e manutenção, uma análise da fisiologia celular ligamentar e como é que elas intervêm no processo de ligamentização tentado saber qual será o tipo de célula que melhor se adequará ao efeito.

A este nível as opções mais aceites e disponíveis na literatura científica são duas: células mesenquimatais ou fibroblastos retirados directamente de ligamentos, como, o melhor exemplo no enquadramento deste trabalho, o LCA mas também outros como o ligamento medial colateral. [43]

Estas diferem entre seres vivos e dependem do local anatómico de onde são colhidas, das diferenças genéticas e epigenéticas da população em estudo, da idade do doente. Assim sendo possuem uma grande variedade fenotípica, na velocidade de crescimento, na qualidade e quantidade dos factores que excretam e nos receptores membranares para os vários tipos de factores. [44]

Por estas razões é necessário cautela e ponderação na leitura das publicações científicas sobre este tema, analisando bem os meios e métodos utilizados para chegarem aos resultados. Porque o que é válido numa população pode não ser válido noutra.

Assim o uso de tipos apropriados de células poderia potencialmente melhorar a funcionalidade e a estrutura das técnicas de engenharia de tecidos, mas pouco se sabe sobre a fonte celular ótima para a engenharia de tecidos de ligamentos. Assim existem vários estudos tentando determinar a fonte celular ideal para a engenharia de tecido do ligamento cruzado anterior (LCA). Estes comparam normalmente fibroblastos isolados do ligamento cruzado anterior, ou do ligamento colateral medial (LCM), bem como as células estaminais mesenquimais da medula óssea (CEM).

Os parâmetros usados para determinar o melhor candidato são: a taxa de proliferação, a excreção de colagénio, a expressão de colagénio tipo I, II e III e a actina-alfa do músculo liso.

Um estudo comparou o desempenho de fibroblastos isolados do LCA e LCM dos CEM derivados de medula óssea em coelhos. Ele descobriu que a taxa de proliferação e a produção de colagénio foram maiores com CEMs do que com fibroblastos. As células sobreviveram pelo menos 6 semanas na articulação do joelho e no grupo CEM. [43] Também descobriram, em coelhos, que as CEMs cresceram mais rapidamente do que os fibroblastos em scaffolds de seda. Além disso, a expressão génica para transcrições e produção de colagénio foi aumentada no grupo CEM em comparação com o grupo fibroblasto. [44]

Fibroblastos

Os fibroblastos podem ser colhidos de diferentes fontes. Cooper et al. concluíram que os fibroblastos colhidos do próprio LCA eram as células mais adequadas para uma continuação do estudo na área e desenvolvimento de ligamentos por engenharia de tecidos em contraste às células derivadas doutros ligamentos. [45] Assim demonstrando mais uma vez a variabilidade entre dos próprios ligamentos entre os vários sítios de colheita.

Fibroblastos de outras fontes, como a pele também foram testados para o seu uso na engenharia de tecidos ligamentares. No entanto, não se tem a certeza de quão bem eles são capazes de funcionar dada a mudança do seu ambiente fisiológico normal, sendo o ambiente biomecânico e fisiológico do joelho bastante extremo. [43]

Contudo estas células apresentam pouca adaptabilidade ao ambiente mecânico e químico pro-inflamatório encontrado na articulação de um joelho com uma lesão do LCA. Então debruçamo-nos para uma segunda hipótese.

Células Estaminais Mesenquimais (CEM)

As células estaminais são de particular interesse na medicina regenerativa. Eles possuem várias características únicas que as distinguem de outros tipos de células. As células estaminais representam células não especializadas, que têm a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células adultas.

A literatura sugere que os CEM's são o método preferido de engenharia de tecidos de ligamentos porque eles podem se diferenciar facilmente em fibroblastos de ligamentos após duas semanas e têm maior adaptabilidade ao ambiente adverso da lesão e cirurgia. [23, 43, 46, 47]

Aqui, é importante distinguir as células-tronco embrionárias, que são verdadeiramente pluripotentes de células-tronco adultas multipotentes. As células estaminais embrionárias (CEEs) só são encontradas nos estádios iniciais do desenvolvimento do organismo. Elas representam o único tipo de célula, que tem a capacidade de se renovar indefinidamente e é verdadeiramente pluripotente. Pode se diferenciar em células de todas as três camadas germinativas. [48]

Em contraste, existe uma variedade de células estaminais adultas multipotentes em todos os tecidos do organismo. Elas são responsáveis pela manutenção da integridade do tecido em que residem. Geralmente, essas células-tronco adultas apresentam um potencial de diferenciação limitado para os tecidos de uma camada germinativa. [48] Este grupo celular muito especial tem três principais características: (1) a capacidade de permanecerem quiescentes e indiferenciadas até serem estimuladas; (2) a habilidade de se diferenciarem em várias linhagens celulares e (3) capacidade de terem mais ciclos de divisão celular de que qualquer outro tipo de células. Por estas razões estas células são convidativas em qualquer processo de substituição tecidual, uma vez que elas podem adquirir quase qualquer tipo de fenótipo final com um ambiente bioquímico adequado.

O facto de estas células poderem se diferenciar em fibroblastos, condrocitos e osteoblastos é a melhor promessa de que se acertarmos no ambiente bioquímico e a normal arquitectura e transmissão de forças no tecido, estas células poderem recriar não só o ligamento como as transições ligamento osso.

Apesar de termos assistido na última década a grandes desenvolvimentos nesta área de investigação, aplicação de terapias celulares em lesões ortopédicas e medicina desportiva, ainda precisamos de muitos estudos para entendermos a posição desta tecnologia na clínica.

Os dados actuais fornecem uma série de abordagens possíveis interessantes para tentar acelerar e melhorar a reabilitação cirúrgica da substituição do LCA com o apoio de células-tronco mesenquimais. Mas considerando os dados ainda limitados, sobretudo a nível de aplicação desta técnica em ligamentos, acredita-se que uma utilização clínica padronizada levará pelo menos mais uma década a se desenvolver. A fim de atingir o pleno potencial terapêutico destas células, um número de perguntas abertas, tem de ser respondida: Além da necessidade de estabelecer dados adicionais sobre a função e a fisiologia da diferenciação celular, a investigação básica na compreensão da regeneração in vivo do ligamento também precisa de ser melhor compendiada.

Especialmente, as vias de sinal têm de ser desmontadas porque a aplicação de injeções é apenas parcialmente suficiente sem o sinal adequado para induzir a regeneração de tecidos.

Um estudo comparou o desempenho de fibroblastos isolados da LCA e LMC a dos CEM derivados de medula óssea em coelhos. Ele descobriu que a taxa de proliferação e a produção de colagénio foram maiores com CEMs do que com fibroblastos. As células sobreviveram pelo menos 6 semanas na articulação do joelho e no grupo CEM. [43] Também descobriram, em coelhos, que as CEMs cresceram mais rapidamente do que os fibroblastos em andaimes de seda. Além disso, a expressão génica para transcrições e produção de colagénio foi aumentada no grupo CEM em comparação com o grupo fibroblasto. [44] Chegaram assim à conclusão que a taxa de proliferação e a excreção de colagénio das CEM foram superiores aos fibroblastos de LCA e LCM, e as CEM poderiam sobreviver por pelo menos 6 semanas na articulação do joelho.

Em resumo, na literatura as CEM parecem ser uma fonte celular potencialmente melhor do que os fibroblastos de LCA e LCM para engenharia de tecido do ligamento cruzado anterior.

Todos esses fatores são importantes para permitir que os engenheiros de tecidos selecionem cuidadosamente a fonte ótima de células e, portanto, maximizarem a eficácia.

Factores de Crescimento (FC)

O uso de fatores de crescimento ganhou muita visibilidade e o seu uso disparou no tratamento de lesões nos tecidos moles desde o final da década de 1990 com o crescer do conhecimento em imunologia. Existe uma grande variedade de factores de crescimento, incluindo factor de crescimento semelhante a insulina (IGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), factor de crescimento de fibroblastos (FGF), entre muitos outros. Têm sido utilizados para melhorar a reparação dos tecidos ligamentares e dos tendões.

Os FC são proteínas que actuam nos núcleos celulares promovendo a ativação de genes relacionados com sínteses proteicas que determinam o futuro papel e caminho de maturação/função celular como: proliferação, migração, sobrevivência, diferenciação. Estes têm a capacidade de influenciar a actividade celular, mas, por si só, não conseguem reparar lesões nem ter algum efeito clínico uma vez que todo o seu mecanismo é feito pelo intermédio celular.

Neste momento na literatura científica já existem vários estudos que usam factores de crescimento em terapias clínicas particularmente em ortopedia, demonstrando que estes são capazes de interferir positivamente na actividade, proliferação e deposição de matriz extra-celular por parte das células.

Visto que as especificidades de um tecido são controladas pelo espectro de factores de sinalização celular presente na matriz é também importante que as futuras investigações sobre o assunto comecem a por a seguinte questão: “Qual é o cocktail de FC que posso usar para o objectivo X no paciente Y”.

Os factores de crescimento têm demonstrado capacidade de potenciar as técnicas de reparação, através da activação das células no local da inoculação, do aumento da proliferação (mitogénese) e da síntese de matrix extracelular por estas células.

Plasma rico em plaquetas (PRP)

Além dos fatores de crescimento mencionados, o uso de plasma rico em plaquetas (PRP), que contém uma multiplicidade de fatores de crescimento, tem sido o centro das atenções como um novo tratamento não invasivo para lesões em atletas que pretendem acelerar o tempo de recuperação. A facilidade de recolha em período pré-operatório e sendo um produto biológico, inócuo, não imunorreactivo uma vez que é autólogo permitiu uma fácil expansão da sua utilização.

O plasma rico em plaquetas (PRP), é uma fracção de plasma de sangue autólogo, com uma concentração de plaquetas aumentada por técnicas de centrifugação. Dependendo do

método de obtenção as características deste concentrado mudam. É possível descrever o tipo de PRP segundo o método de produção. [49, 50]

Inicialmente pensava-se que as plaquetas agiam exclusivamente na cascata de coagulação mas foi descoberto que as plaquetas libertam proteínas bioativas responsáveis por atraírem macrófagos, células estaminais ou osteoblastos, entre outras, que permitem promover a remoção de tecido necrosado e também aumentar a regeneração tecidual e cicatrização. Constituem assim um reservatório substancial de factores de crescimento e moléculas de sinalização, incluindo citoquinas catabólicas derivadas de leucócitos e fibrinogénio. [51, 52]

Assim quando excretados e captados por outras células, são responsáveis por aumentar a mitose celular e produção de colagénio, recrutar outras células para o local da lesão e induzir a diferenciação celular.

O PRP é constituído por diferentes FC como: fator de crescimento derivado de plaquetas; fator de crescimento de endotelial; fator de crescimento transformador beta (TGF- β); factor de crescimento insulin-like (ex. IGF-1; IGF-2); factor de crescimento hepatocitario; factor de crescimento do tecido conjuntivo; entre muitos outros. [53]

Atualmente, a investigação nesta área tem dado particular interesse ao fator transformador de crescimento beta (TGF- β), proteína óssea morfogenética (BMP) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF). [54]

Uma vez que o PRP contém, em diferentes quantidades, todos os componentes do sangue, dependendo do protocolo utilizado, os leucócitos podem ser encontrados em PRP em quantidades diferentes. [49]

A presença de células brancas no PRP confere-lhe uma resistência natural a processos infecciosos e alérgicos, e estudos apontam para que promova uma resposta inflamatória positiva levando a neovascularização ligamentar acelerando assim a regeneração.

Mas por outro lado também existem alguns estudos em que os leucócitos induzem uma resposta inadequada no tecido levando a um atraso na cicatrização e a uma maior fibrose do tecido resultante. Assim alguns estudos concluem que uma preparação de PRP sem leucócitos conduz a um melhor resultado.

A concentração óptima de plaquetas, leucócitos e outros componentes do plasma continua a ser alvo de investigação sendo que o clínico deve estar ciente de que o efeito PRP não se baseia apenas na concentração de trombócitos. [55]

O que se faz actualmente a partir destes factores de crescimento no caso da reparação do LCA são injeções intra-capsulares de PRP ou outro composto. O problema desta prática é que a arquitectura dinâmica não só da estrutura articular em si como do próprio meio uma vez que está embainhado em líquido sinovial próprio da articulação faz com que não exista maneira de direccionar a terapia ao tecido pretendido. O scaffold pode fazer diferença ajudando a direccionar a terapia assim resolvendo este problema.

Actualmente existem resultados contraditórios em relação a influência de terapias a base de PRP na integração do novo ligamento na cirurgia da lesão do LCA. Houve tentativas de aumentar a incorporação da enxertos através de terapias com PRP no túnel ósseo que é formado durante a cirurgia sem diferenças significativas. [56]

Scaffolds - materiais e arquitectura

A engenharia de tecidos requer uma compreensão dos processos biológicos necessários para a proliferação celular e diferenciação. O processo de aplicação da engenharia de tecidos encontra o seu expoente máximo na construção de scaffolds, um meio de suporte tridimensional essencial para a proliferação e diferenciação apropriadas de células no scaffold. Uma vasta gama de scaffolds sintéticos e biológicos feitos de alginato, quitosano, colagénio ou ácido hialurónico têm sido utilizados na engenharia de tecidos funcionais e na medicina regenerativa. Actualmente os materiais candidatos a serem utilizados na cirurgia ligamentar são o ácido hialurónico, seda, colagénio e textured poly(L-lactide). [57-59]

Considerando as propriedades fisiológicas do tecido ligamentar, uma técnica para seleccionar o sítio de aplicação dentro da própria articulação das outras terapias (celulares e através de FC) seria recorrer ao uso de scaffolds com, por exemplo Membrana Extra-Celular (MEC) nativa que poderia ser “embebido” por FC ou PRP e assim aumentaria a capacidade de colonização e adesão celular.

Com base nessa hipótese, a maioria dos estudos atuais em engenharia de tecido utilizam técnicas de aplicação de scaffolds de diferentes maneiras.

Actualmente as técnicas de aplicação injeção direta da suspensão celular ou FC nos túneis ósseos ou na superfície óssea ou ligamentar antes da refixação do ligamento para melhorar a cicatrização do tendão e osso, começa a ser questionada, uma vez que desta maneira não há forma como controlar, com precisão, o local de atuação das terapias. Não atingido assim o pleno potencial destas terapias.

O interesse da introdução destes materiais nas cirurgias de reconstrução do LCA são dois: (1) o de substituição da MEC do ligamento de forma temporária e/ou (2) de suporte mecânico dando mais resistência ao tecido de substituição. São usados para isto materiais sintéticos ou biológicos sendo os biológicos normalmente preferidos na literatura. Actualmente entramos na terceira geração destes materiais onde eles são bioativos e biodegradáveis. [60] Assim sendo as células conseguem colonizar este tecido e ao longo do tempo reabsorvendo-o e substituí-lo por nova MEC.

A maioria das utilizações actuais de scaffolds, nas cirurgias de reparação de ligamentos e tendões, tem como objectivo promover suporte mecânico adicional à reparação original, ajudando esta a lidar com as cargas a que é sujeita durante o tempo de maturação do tecido.

Para isso a arquitetura e os materiais em que é feito o aparelho tem de ter rigidez e força para aguentar as tensões, e ser absorvido a uma taxa adequada para o tecido que pretende substituir.

Por outro lado a MEC construído pelas células é promovida entre outros factores por mecanorreceptores presentes nas células do tecido que são activados quando as células sofrem deformação por esta razão para haver uma activação celular para a reparação biológica o scaffold deva ter uma rigidez que permita uma boa distribuição da carga, promovendo algum suporte mas ao mesmo tempo assegurar que alguma carga seja aplicada e compensada pelo tecido de substituição. Ainda assim a força tênsil aguentada pelo aparelho deve ser maior do que o pico de resistência tensional do tecido de substituição e ao longo da sua degradação optimamente similar com a do tecido original, dando assim a certeza que o aparelho aguenta cargas normais até ao fim da sua substituição por nova MEC. [61]

O scaffold deve idealmente possuir e reter estas propriedades mecânicas ao longo do tempo necessário para que uma reparação funcional tecidual ocorra sendo reabsorvido pelo tecido de substituição. Esta etapa é crucial e como é óbvio possui uma grande variabilidade entre os doentes. Dependendo da idade, factores genéticos, epigenéticos e factores externos.

Tendo todo o material uma curva de deformação ou estiramento em relação a força aplicada o objectivo aqui é ficar na fase em que o material não chegue a parte linear da curva sobre cargas normais, dando segurança que o tecido de substituição esteja confortável para se renovar, deixa-lo por isso sobre uma liberdade controlada. [61, 62]

Problematicamente muitos materiais usados para a criação dos scaffolds tem força e resistência substancialmente menores que o LCA, e requerem ser estirados até mais de 100% até desenvolver a força requerida, ou muito superior não dando a possibilidade ao tecido de retomar a sua função biológica antes de o scaffold ser degradado. Porém foram já, recentemente, desenvolvidos aparelhos sintéticos que mimizam aproximadamente a biomecânica de ligamentos da coifa dos rotadores. [63, 64]

Ainda para mais obviamente o scaffold e os seus produtos de degradação não devem causar toxicidade ao hospedeiro.

Bridge-Enhanced ACL Repair (BEAR Scaffold)

Este scaffold é construído a partir de proteínas da matriz extracelular, incluindo o colagénio, obtidas a partir de tecido bovino, o tecido é antes decelularizado e muito pouco DNA bovino é encontrado no material final evitando assim reações imunológicas. [65, 66] O scaffold é hidrofílico e capaz de absorver até 5 vezes o seu peso em fluido.

O BEAR foi fabricado no Boston Children's Hospital e é perfeitamente biocompatível completando todos os testes de biocompatibilidade e esterilidade antes do uso nos estudos e na prática clínica. [66, 67]

Quando embebido em líquidos (água, sangue ou PRP) o BEAR amolece, tornando-o compatível e amoldável ao entalhe intra-articular e capaz de preencher os contornos irregulares do espaço entre as extremidades do ligamento rasgado. O material foi testado em estudos pré-clínicos em animais de grande porte [65, 68, 69] nos quais se verificou que a LCA cicatrizante apresentava propriedades mecânicas semelhantes a um enxerto ósseo-ligamento-osso da rótula aos 3, 6 e 12 meses após a cirurgia. [39, 70]

Esta técnica não requer reaproximação exata de tecido, pois o scaffold biologicamente activo preenche a lacuna entre as extremidades do ligamento rasgado. O sangue ou PRP autólogo é adicionado ao suporte de matriz extracelular e assim mantido no local de ação limitando as perdas para o fluido sinovial do joelho, onde as células do sangue estimulam a cicatrização do ligamento. [71, 72]

Além disso, os suínos tratados com o scaffold BEAR apresentaram uma taxa significativamente menor de osteoartrite do que aqueles tratados com reconstrução do LCA. [39]

Assim esta nova técnica de reparação do LCA pode fornecer uma nova opção de tratamento menos invasiva, evitando o entalhe do sítio dador e parece reduzir a osteoartrite após a lesão articular.

Bioreactores

Esta investigação hoje em dia está ainda numa fase pré-clínica, mas a possibilidade de utilização clínica no futuro obriga-me a fazer referência à tecnologia.

Outra estratégia que tem sido usada para haver uma maturação das células já implementadas no scaffold é a utilização de bioreactores. Estes são usados *in vitro* na tentativa de fornecer o ambiente homeostático fisiológico das células antes de elas serem usadas nas cirurgias.

São capazes para isso de manter um constante suprimento de nutrientes e de remover os produtos de metabolismo celular.

Os bioreactores são uma grande ajuda no campo emergente da engenharia de tecidos. A formação de neo-tecidos a partir de linhagens de células pluripotentes oferece potencialmente uma fonte de tecido para uso clínico sem a morbilidade significativa do local do doador associada a cirurgia reconstrutiva do LCA. O desenho de bioreactor moderno está a tornar-se cada vez mais complexo para proporcionar uma fonte tanto expansível de células pluripotentes prontamente disponíveis como para facilitar a sua diferenciação controlada num ligamento ou tendão clinicamente aplicável como o neo tecido.

Tomando em consideração o crescente conhecimento da biologia e função do ligamento, os métodos de cultura convencionais não parecem satisfazer os requisitos bioquímicos e sobretudo biomecânicos para gerar ligamentos *in vitro*. As técnicas de cultura tradicionais não fornecem esta estimulação mecânica, assim a utilização de um sistema bioreactor é capaz de colmatar a diferença que existe entre sistemas *in vitro* e *in vivo*, criando ambientes bioquímicos e biomecânicos adequados.

Um sistema de bioreactor que submete a cultura celular a carga dinâmica, imitando as condições fisiológicas do tendão / ligamento *in vivo*, ao mesmo tempo que permite a proliferação celular, diferenciação e produção de matriz num ambiente mecânico, pode proporcionar uma solução. [73]

Terapia genética

A terapia genética é uma recente estratégia promissora para modular de forma durável o aumento de vários factores terapêuticos excretados pelas células, essenciais para a cicatrização de tecidos lesados, tais como ligamentos. Assim, várias estratégias de terapia genética têm sido usadas na tentativa de melhorar a cura de ligamentos. Sabe-se actualmente que vários factores são capazes de induzir a formação ligamentar. [74]

Para isso utilizamos vectores não virais de entrega de genes ou vectores derivados de vírus com vias de entrada naturais na célula (adenovírus, lentivírus, retrovírus) para alterar a síntese de proteínas endógenas dos tecidos através da mediação de determinada expressão genética. [74]

Estas podem ter o potencial de modular as alterações bioquímicas após uma lesão de LCA, tais como variações na expressão de colagénio.

A transferência de genes também foi utilizada para promover a osteogénese no local de inserção óssea após a reconstrução cirúrgica, aumentando a fixação dos ligamentos nos ossos e para promover a cicatrização, reduzindo a inflamação. [74-76]

A terapia genética como um todo está a passar por um ressurgimento, e vários protocolos estão a iniciar testes de fase III.

Conclusão

Em conclusão o tratamento do LCA com recurso a suturas foi um procedimento que foi completamente substituído pela reconstrução do LCA, principalmente devido à falta de confiabilidade dos resultados e a taxa de ruptura da cirurgia original.

No LCM, que cura com sucesso, a lacuna é preenchida com um coágulo de sangue, provisório, que permite que as células circundantes invadam e produzam uma cicatriz fibrovascular funcional. Em contraste, a formação de um coágulo de ligação não é observada no LCA, provavelmente devido ao ambiente intra-articular com líquido sinovial. Sem cicatrização do tecido em si, as suturas de um reparo primário eventualmente falham.

A colocação cirúrgica de um Scaffold permite estabilizar um coágulo e/ou uma solução de factores de crescimento como o PRP, de maneira provisória durante o intervalo de tempo necessário até ser substituído por tecido ligamentar. Como foi demonstrado com o procedimento BEAR a re aproximação das extremidades rasgadas do LCA durante várias semanas com recurso a um scaffold e FC resultou num LCA cicatrizado com propriedades mecânicas semelhantes a uma cirurgia de substituição e menos desenvolvimento de osteoartrite pós-traumática.

Este reforço biológico para a reparação do LCA tem-se mostrado promissor em estudos pré-clínicos, dados clínicos ainda não estão disponíveis, uma vez que a técnica só recentemente foi aprovada para um uso em humanos.

Portanto, continuam a ser necessários estudos para averiguar se estes scaffold biologicamente ativos que preenchem a lacuna entre as extremidades dos tecidos rasgados podem um dia tornar a reparação do LCA uma opção viável para pacientes com lesões e assim substituir as substituições.

Portanto, apesar de ainda poucos ensaios clínicos, há motivos para um otimismo cauteloso neste tema. Sendo obvio que a engenharia de tecidos vai desempenhar um papel importante nos próximos anos. Num futuro próximo, uma abordagem interdisciplinar com biólogos, bio engenheiros e clínicos será essencial para alcançar a aplicação clínica de todas estas técnicas.

Bibliografia

1. Daniel, D.M., et al., Fate of the ACL-injured patient. A prospective outcome study. *Am J Sports Med*, 1994. **22**(5): p. 632-44.
2. Mascarenhas, R., et al., Bone-patellar tendon-bone autograft versus hamstring autograft anterior cruciate ligament reconstruction in the young athlete: a retrospective matched analysis with 2-10 year follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2012. **20**(8): p. 1520-7.
3. Laurencin, C.T. and J.W. Freeman, Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials*, 2005. **26**(36): p. 7530-6.
4. Rodrigues, M.T., Reis, R. L. and Gomes, M. E. (2013), Engineering tendon and ligament tissues: present developments towards successful clinical products. *J Tissue Eng Regen Med*, 7: 673–686. doi: 10.1002/term.1459.
5. Moses, B., J. Orchard, and J. Orchard, Systematic review: Annual incidence of ACL injury and surgery in various populations. *Res Sports Med*, 2012. **20**(3-4): p. 157-79.
6. Gordon MD, Steiner ME (2004) Anterior cruciate ligament injuries. In: *Orthopaedic Knowledge Update Sports Medicine III*, Garrick JG. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont.
7. Albright JC, Carpenter JE, Graf BK (1999) Knee and leg: so tissue trauma. In: *Orthopaedic Knowledge Update 6*, Beaty JH. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont.
8. Van de Velde, S.K., T.J. Gill, and G. Li, Evaluation of kinematics of anterior cruciate ligament-deficient knees with use of advanced imaging techniques, three-dimensional modeling techniques, and robotics. *J Bone Joint Surg Am*, 2009. **91 Suppl 1**: p. 108-14.
9. Taylor, J.B., et al., Evaluation of the effectiveness of anterior cruciate ligament injury prevention programme training components: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*, 2015. **49**(2): p. 79-87.
10. Soligard, T., et al., Comprehensive warm-up programme to prevent injuries in young female footballers: cluster randomised controlled trial. *BMJ*, 2008. **337**: p. a2469.
11. Li, G., et al., Anterior cruciate ligament deficiency alters the in vivo motion of the tibiofemoral cartilage contact points in both the anteroposterior and mediolateral directions. *J Bone Joint Surg Am*, 2006. **88**(8): p. 1826-34.
12. Marshall, J.L., et al., The anterior cruciate ligament: a technique of repair and reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*, 1979(143): p. 97-106.
13. Kaplan, N., T.L. Wickiewicz, and R.F. Warren, Primary surgical treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A long-term follow-up study. *Am J Sports Med*, 1990. **18**(4): p. 354-8.
14. Strand, T., et al., Long-term follow-up after primary repair of the anterior cruciate ligament: clinical and radiological evaluation 15-23 years postoperatively. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2005. **125**(4): p. 217-21.
15. Legnani, C., et al., Management of anterior cruciate ligament rupture in patients aged 40 years and older. *J Orthop Traumatol*, 2011. **12**(4): p. 177-84.
16. Tjoumakaris, F.P., et al., Complications in brief: Anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*, 2012. **470**(2): p. 630-6.
17. Shaerf, D.A., et al., Anterior cruciate ligament reconstruction best practice: A review of graft choice. *World J Orthop*, 2014. **5**(1): p. 23-9.
18. Mai, H.T., et al., Performance-Based Outcomes After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Professional Athletes Differ Between Sports. *Am J Sports Med*, 2017: p. 363546517704834.
19. Petersen, W., C. Fink, and S. Kopf, Return to sports after ACL reconstruction: a paradigm shift from time to function. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2017. **25**(5): p. 1353-1355.
20. Sepulveda, F., et al., Anterior Cruciate Ligament Injury: Return to Play, Function and

- Long-Term Considerations. *Curr Sports Med Rep*, 2017. **16**(3): p. 172-178.
21. Hefti, F. and T.M. Stoll, [Healing of ligaments and tendons]. *Orthopade*, 1995. **24**(3): p. 237-45.
22. Frank, C.B., Ligament structure, physiology and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004. **4**(2): p. 199-201.
23. Hoffmann, A. and G. Gross, Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *Int Orthop*, 2007. **31**(6): p. 791-7.
24. R.A. Hauser*, E.E.D., H.J. Phillips, A.C. Newlin, R.E. Moore and B.A. Woldin, Ligament Injury and Healing: A Review of Current Clinical Diagnostics and Therapeutics. *The Open Rehabilitation Journal*, 2013, 6, 1-20.
25. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 2009. **37**(5): p. 1528-42.
26. Murray, M.M. and B.C. Fleming, Biology of anterior cruciate ligament injury and repair: Kappa delta ann doner vaughn award paper 2013. *J Orthop Res*, 2013. **31**(10): p. 1501-6.
27. Xie, J., et al., TGF-beta1 induces the different expressions of lysyl oxidases and matrix metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after mechanical injury. *J Biomech*, 2013. **46**(5): p. 890-8.
28. Xie, J., et al., TNF-alpha induced down-regulation of lysyl oxidase family in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts. *Knee*, 2014. **21**(1): p. 47-53.
29. Robson, A.W., VI. Ruptured Crucial Ligaments and their Repair by Operation. *Ann Surg*, 1903. **37**(5): p. 716-8.
30. Feagin, J.A., Jr. and W.W. Curl, Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study. *Am J Sports Med*, 1976. **4**(3): p. 95-100.
31. Spindler, K.P., et al., Anterior cruciate ligament reconstruction autograft choice: bone-tendon-bone versus hamstring: does it really matter? A systematic review. *Am J Sports Med*, 2004. **32**(8): p. 1986-95.
32. Herrington, L., et al., Anterior cruciate ligament reconstruction, hamstring versus bone-patella tendon-bone grafts: a systematic literature review of outcome from surgery. *Knee*, 2005. **12**(1): p. 41-50.
33. Biau, D.J., et al., Bone-patellar tendon-bone autografts versus hamstring autografts for reconstruction of anterior cruciate ligament: meta-analysis. *BMJ*, 2006. **332**(7548): p. 995-1001.
34. Engelen-van Melick, N., et al., Functional performance 2-9 years after ACL reconstruction: cross-sectional comparison between athletes with bone-patellar tendon-bone, semitendinosus/gracilis and healthy controls. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2017. **25**(5): p. 1412-1423.
35. Shen, W., et al., Long-term effects of knitted silk-collagen sponge scaffold on anterior cruciate ligament reconstruction and osteoarthritis prevention. *Biomaterials*, 2014. **35**(28): p. 8154-63.
36. Chiba, D., et al., Tunnel malpositions in anterior cruciate ligament risk cartilaginous changes and bucket-handle meniscal tear: Arthroscopic survey in both primary and revision surgery. *J Orthop Sci*, 2017.
37. Robayo, L.M., et al., New ligament healing model based on tissue-engineered collagen scaffolds. *Wound Repair Regen*, 2011. **19**(1): p. 38-48.
38. Fisher, M.B., et al., Potential of healing a transected anterior cruciate ligament with genetically modified extracellular matrix bioscaffolds in a goat model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2012. **20**(7): p. 1357-65.
39. Murray, M.M. and B.C. Fleming, Use of a bioactive scaffold to stimulate anterior cruciate ligament healing also minimizes posttraumatic osteoarthritis after surgery. *Am J Sports Med*, 2013. **41**(8): p. 1762-70.
40. Nourissat, G., et al., Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12248.

41. Khan, W.S., A.A. Malik, and T.E. Hardingham, Stem cell applications and tissue engineering approaches in surgical practice. *J Perioper Pract*, 2009. **19**(4): p. 130-5.
42. Khan, W.S., D.S. Johnson, and T.E. Hardingham, The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *Knee*, 2010. **17**(6): p. 369-74.
43. Ge, Z., J.C. Goh, and E.H. Lee, Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell Transplant*, 2005. **14**(8): p. 573-83.
44. Liu, H., et al., A comparison of rabbit mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament fibroblasts responses on combined silk scaffolds. *Biomaterials*, 2008. **29**(10): p. 1443-53.
45. Cooper, J.A., Jr., et al., Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament. *Biomaterials*, 2006. **27**(13): p. 2747-54.
46. Woo, S.L., et al., *Tissue engineering of ligament and tendon healing*. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(367 Suppl): p. S312-23.
47. Sahoo, S., et al., Bioactive nanofibers for fibroblastic differentiation of mesenchymal precursor cells for ligament/tendon tissue engineering applications. *Differentiation*, 2010. **79**(2): p. 102-10.
48. Ehnert, S., et al., The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch Surg*, 2009. **394**(6): p. 985-97.
49. Boswell, S.G., et al., Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*, 2012. **28**(3): p. 429-39.
50. Mazzocca, A.D., et al., Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*, 2012. **94**(4): p. 308-16.
51. Eppley, B.L., J.E. Woodell, and J. Higgins, Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **114**(6): p. 1502-8.
52. McCarrel, T. and L. Fortier, Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res*, 2009. **27**(8): p. 1033-42.
53. Mei-Dan, O., et al., Autologous platelet-rich plasma: a revolution in soft tissue sports injury management? *Phys Sportsmed*, 2010. **38**(4): p. 127-35.
54. Muller, B., K.F. Bowman, Jr., and A. Bedi, *ACL graft healing and biologics*. *Clin Sports Med*, 2013. **32**(1): p. 93-109.
55. Pavlovic, V., et al., Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Med (Wars)*, 2016. **11**(1): p. 242-247.
56. Silva, A. and R. Sampaio, Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2009. **17**(6): p. 676-82.
57. Kreja, L., et al., Effects of mechanical strain on human mesenchymal stem cells and ligament fibroblasts in a textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*, 2012. **23**(10): p. 2575-82.
58. Laurent, C.P., et al., Mechanical behaviour of a fibrous scaffold for ligament tissue engineering: finite elements analysis vs. X-ray tomography imaging. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2014. **40**: p. 222-33.
59. Hu, Y., et al., [Application of silk-based tissue engineering scaffold for tendon / ligament regeneration]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2016. **45**(2): p. 152-60.
60. Navarro, M., et al., Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*, 2008. **5**(27): p. 1137-58.
61. Butler, D.L., et al., Evolving strategies in mechanobiology to more effectively treat damaged musculoskeletal tissues. *J Biomech Eng*, 2013. **135**(2): p. 020301.
62. Butler, D.L., et al., Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res*, 2008. **26**(1): p. 1-9.

63. Derwin, K.A., et al., Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device. *J Bone Joint Surg Am*, 2009. **91**(5): p. 1159-71.
64. McCarron, J.A., et al., Improved time-zero biomechanical properties using poly-L-lactic acid graft augmentation in a cadaveric rotator cuff repair model. *J Shoulder Elbow Surg*, 2010. **19**(5): p. 688-96.
65. Yoshida, R., P. Vavken, and M.M. Murray, Decellularization of bovine anterior cruciate ligament tissues minimizes immunogenic reactions to alpha-gal epitopes by human peripheral blood mononuclear cells. *Knee*, 2012. **19**(5): p. 672-5.
66. Proffen, B.L., et al., Electron beam sterilization does not have a detrimental effect on the ability of extracellular matrix scaffolds to support in vivo ligament healing. *J Orthop Res*, 2015. **33**(7): p. 1015-23.
67. Proffen, B.L., et al., Bridge-enhanced ACL repair: A review of the science and the pathway through FDA investigational device approval. *Ann Biomed Eng*, 2015. **43**(3): p. 805-18.
68. Joshi, S.M., et al., Collagen-platelet composite enhances biomechanical and histologic healing of the porcine anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med*, 2009. **37**(12): p. 2401-10.
69. Magarian, E.M., et al., Safety of intra-articular use of atelocollagen for enhanced tissue repair. *Open Orthop J*, 2012. **6**: p. 231-8.
70. Vavken, P., et al., Biomechanical outcomes after bioenhanced anterior cruciate ligament repair and anterior cruciate ligament reconstruction are equal in a porcine model. *Arthroscopy*, 2012. **28**(5): p. 672-80.
71. Harrison, S.L., P. Vavken, and M.M. Murray, Erythrocytes inhibit ligament fibroblast proliferation in a collagen scaffold. *J Orthop Res*, 2011. **29**(9): p. 1361-6.
72. Harrison, S., et al., Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med*, 2011. **39**(4): p. 729-34.
73. Wang, T., et al., Bioreactor design for tendon/ligament engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2013. **19**(2): p. 133-46.
74. Evans, C.H. and J. Huard, Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. **11**(4): p. 234-42.
75. Lattermann, C., et al., Gene transfer to the tendon-bone insertion site. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2004. **12**(5): p. 510-5.
76. Coen, M.J., et al., Lentiviral-based BMP4 in vivo gene transfer strategy increases pull-out tensile strength without an improvement in the osteointegration of the tendon graft in a rat model of biceps tenodesis. *J Gene Med*, 2011. **13**(10): p. 511-21.